



1/9/1 (Item 1 from file: 351) Links
Derwent WPI
(c) 2005 Thomson Derwent. All rights reserved.

011403372

WPI Acc No: 1997-381279/199735

XRAM Acc No: C97-122335

**Antifungal agents containing azole(s) and lactoferrin
hydrolysate - for treatment of dermatophytosis and dermatomycosis**

Patent Assignee: MORINAGA MILK IND CO LTD (MORG)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 9165342	A	19970624	JP 95347405	A	19951214	199735 B

Priority Applications (No Type Date): JP 95347405 A 19951214

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 9165342	A	10	A61K-038/16		

Abstract (Basic): JP 9165342 A

Novel antifungal agents contain as active component an azole-type anti-fungal compound and lactoferrin hydrolysates or antifungal peptides derived from the hydrolysates.

USE - The antifungal agents are used for treatment of dermatophytosis and dermatomycosis.

ADVANTAGE - The antifungal agents of this invention show the same as or higher effect at one quarter to one sixteenth the dose of known antifungal compounds, so the dose of these compounds having adverse reactions can be reduced. Lactoferrin hydrolysates have no toxicity since they have been used as a part of food.

Dwg.0/0

Title Terms: ANTIFUNGAL; AGENT; CONTAIN; AZOLE; LACTOFERRIN; HYDROLYSATE; TREAT; DERMATOPHYTOSIS; DERMATOMYCOSIS

Derwent Class: B03; B04; C02; C03

International Patent Class (Main): A61K-038/16

International Patent Class (Additional): A01N-043/50; A01N-043/647; A61K-031/41; C07K-014/79

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B04K; C04-B04K; B07-D02; C07-D02; B07-D03; C07-D03; B14-A04; C14-A04

(10) 日本国特許庁 (J.P.)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-165342

(43) 公開日 平成9年(1997)6月23日

(51) Int. Cl. ⁶	国際記号	特許庁記号	P I	特許庁記号
A 61 K 35/10	ADZ		A 61 K 37/14	ADZ
A 01 N 43/50			A 01 N 43/50	
43/507			43/507	
A 61 K 31/41			A 61 K 31/41	
C 07 K 14/79	ZNA		C 07 K 14/79	ZNA

特許庁記号 本特許 請求項の第6 頁 (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平7-34465

(22) 出願日 平成7年(1995)12月11日

(71) 出願人 000006127

森永乳業株式会社

東京都港区芝5丁目23番1号

(72) 発明者 山口 英樹

神奈川県川崎市高津区翠谷2-15-6

(72) 発明者 渡辺 茂

東京都板橋区板橋4-6B-15-033

(72) 発明者 早田 玄紀

神奈川県藤沢市東原3-1-83 森永乳業

株式会社栄養科学研究所内

(74) 代理人 工藤 力

図特許に続く

(54) 【発明の名称】 抗真菌剤

(57) 【要約】

【課題】 少量で有効であり、副作用が少なく、耐性菌の出現頻度が少ない抗真菌剤を提供する。

【解決手段】 アゾール系抗真菌剤及びグルコフエリン類の加水分解物又はグルコフエリン類の加水分解物由来の糖鎖性ペプチドを有効成分として含む抗真菌剤。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アゾール系抗真菌剤及びラクトフェリン等の加水分解物又はラクトフェリン等の加水分解由来の抗菌性ペプチドを有効成分として含有する抗真菌剤。

【請求項2】 アゾール系抗真菌剤が、フルコナゾール、イトラコナゾール、ボトリマゾール、ケトコナゾール、ラノコナゾール又はこれらの混合物である請求項1に記載の抗真菌剤。

【請求項3】 ラクトフェリン等の加水分解由来の抗菌性ペプチドが、牛乳若しくは人乳由来のラクトフェリン等の加水分解物から得られたペプチド、このペプチドと同一のアミノ酸配列を含む化学合成されたペプチド、それらの混合物、又はこれらの2種以上の混合物である請求項1又は請求項2に記載の抗真菌剤。

【請求項4】 ラクトフェリン等の加水分解由来の抗菌性ペプチドが、配列番号1乃至配列番号8のいずれかに記載されたアミノ酸配列を有する請求項1乃至請求項3の抗真菌剤。

【請求項5】 アゾール系抗真菌剤（即ち（重量））に対してラクトフェリン等の加水分解物が、少なくとも100倍（重量）の割合で含有されている請求項1又は請求項2に記載の抗真菌剤。

【請求項6】 アゾール系抗真菌剤（即ち（重量））に対してラクトフェリン等の加水分解物由来の抗菌性ペプチドが、少なくとも1/5部（重量）の割合で含有されている請求項1乃至請求項4に記載の抗真菌剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、アゾール系抗真菌剤及びラクトフェリン加水分解物又はラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを有効成分として含有する抗真菌剤に関するものであり、更に詳しくは、本発明は、アゾール系抗真菌剤と哺乳動物の主として乳汁に存在する生理活性蛋白質であるラクトフェリン等の加水分解物又はラクトフェリン等の加水分解由来の抗菌性ペプチドとを併用することにより、従来のアゾール系抗真菌剤と比較してその有効成分の使用量を顕著に低減することを可能とすると共に、副作用で使い抗真菌剤が得られ、副作用が少なく、耐性菌の出現頻度を低下させることが可能な新規抗真菌剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 真菌性皮膚症は、起病の便所が表皮、毛髪、爪等の角化組織、口腔、陰部の皮膚に隣接する枯膜部位に限定される疾患と定義され、発症頻度が最も高い疾患である。代表的な真菌性皮膚症の一つとして知られている皮膚糸状菌症（白癬）の発症率は、全人口の10%以上にも及び、しかも再発又は再感染を繰り返す症例も多数認められ、足白癬、体部白癬、股部白癬等多様な病態が知られている。

【0003】 従って代表的な真菌性皮膚症として、カン

ジタ症が知られている。カンジタ症は、口腔カンジタ症、食道・陰部カンジタ症、外陰部カンジタ症等の疾患が、カンジタ菌の感染によって惹起され、腎臓腎炎、関節炎、腸間質性肺炎、爪白癬、結核炎等のカンジタ症も多く知られている。また、妊婦でのカンジタ菌の感染増殖がアトピー性皮膚炎の原因になっていることも報告されている（フレグーの著書、第11巻、第768〜772ページ、1991年）。

【0004】 一方、近年、至極な存在性皮膚症が頻りに増加しているが、その背景には、広域抗生剤、抗真菌剤、免疫抑制剤の多用、経口避妊薬等多くの薬剤の投与及び高カロリー輸液、免疫抑制剤等の使用、更には、エイズ等免疫不全状態にある患者の増加があり、臨床上の大きな問題となっている。

【0005】 従来、内服抗真菌剤として真菌症の治療に使用される抗真菌剤は、ポリエン系のアムホテリシンB、フルオロピリジンのフルシトシン、イミダゾール系（アゾール系）のミコナゾール及びトリアゾール系（アゾール系）のフルコナゾールの4剤のみであったが、1980年9月にアゾール系のイトラコナゾールが市販された。

【0006】 これらの抗真菌剤のターゲットとなる真菌の種類と薬剤感受性は、それぞれの抗真菌剤によって異なるが、カンジタ菌、クリプトコッカス菌、アスペルギルス菌、トリコフィトン菌、マラセチア菌、コキシイオイデス菌等である。

【0007】 アゾール系として総称される抗真菌剤は全て化学合成によって作られ、イミダゾール環又はトリアゾール環を有し、生物活性においても類似の性状を示している。特に真菌細胞の細胞膜に存在するエルゴステロール合成経路におけるステロール C-14メチル還元酵素が、抗真菌剤の作用標的となっている点で共通している。

【0008】 単剤療法として用いられているこのような内服抗真菌剤の使用の現状は、アゾール剤の占有率が大きい。アゾール剤がこのような常用されるのは、アムホテリシンB及びフルシトシンと比較して安全性が高いこと、耐性菌が出現しにくいこと等の利点によるものである。しかしながら、最も大きい占有率を有するフルコナゾール（アゾール系抗真菌剤）について、カンジタ症及びクリプトコッカス症に対する有効率に比較して、アスペルギルス症に対する有効率が低いことが報告されている（化学療法の新経、第10巻、第17〜26ページ、1994年）。

【0009】 一般にアゾール系は菌的に作用するので、患者の感受性能力が若しくは低下している場合又は免疫性の重篤な感染が惹起されている場合には有効しにくいとされている（化学療法の新経、第10巻、第17〜26ページ、1994年）。このように、現在のアゾール系には、殺菌的作用が存在しないため、比較的少量の薬

前記の長期間保存が必要とされている（化学療法の特刊、第10巻、第17〜26ページ、1994年）。従って、このような抗真菌剤の長期安定性による経路を、腎臓、下痢、嘔吐等の副作用の発生が、臨床問題であり、更に、長期投与によってもたらされる真菌性肺病の発症率低下が懸念されている。

【0010】一方、抗真菌剤であるラクトフェリンの加水分解物、またはラクトフェリンに由来するペプチドが、抗真菌活性あるいは抗真菌性を発現することが知られている（特開平5-320068号公報、特開平5-92994号公報）、また、抗生物質とラクトフェリンとの複合物またはラクトフェリン関連抗真菌ペプチドを含む抗真菌剤について報告されている（特開平5-310584号公報）が、合成抗真菌剤であるアゾール系抗真菌剤と、ラクトフェリンの加水分解物またはラクトフェリンに由来する抗真菌ペプチドとを組み合わせることで、抗真菌活性が増強されることについて検討されておらず、報告も皆無である。

【0011】このような従来技術の状況から、少量の使用で殺菌的作用を有する抗真菌剤、すなわち、副作用が少なく、かつ強い抗真菌作用を有する抗真菌剤又は抗真菌剤の使用法の開発が待望されていた。

【0012】本発明が解決しようとする課題は、前記従来技術に鑑みて新規な抗真菌剤について鋭意研究を行った結果、アゾール系抗真菌剤に、ラクトフェリンの加水分解物あるいはラクトフェリン由来抗真菌ペプチドを添加することにより、アゾール系抗真菌剤が、従来の用量よりもはるかに少量で、強い抗真菌活性を発現することを見出し、本発明を完成した。

【0013】本発明の目的は、少量で有効であり、副作用が少なく、耐性菌の出現頻度が少ない抗真菌剤を提供することである。

【0014】【課題を解決するための手段】前記課題を解決する本発明は、アゾール系抗真菌剤及びラクトフェリンの加水分解物又はラクトフェリンの加水分解物由来の抗真菌ペプチドを含有成分として含有する抗真菌剤であり、アゾール系抗真菌剤が、フルコナゾール、イトラコナゾール、クロトリマゾール、ゲトコナゾール、ランコナゾール又はこれらの混合物であること、ラクトフェリンの加水分解物由来の抗真菌ペプチドが、牛乳若しくは人乳由来のラクトフェリンの加水分解物から単離されたペプチド、このペプチドと同一のアミノ酸配列を含む化学合成されたペプチド、それらの混合物、又はこれらの2倍以上の混合物であること、ラクトフェリンの加水分解物由来の抗真菌ペプチドが、並列番号1乃至並列番号8のいずれかに記載されたアミノ酸配列を有すること、アゾール系抗真菌剤1部（重量）に対してラクトフェリンの加水分解物が、少なくとも100部（重量）の割合

で含有されていること、及びアゾール系抗真菌剤1部（重量）に対してラクトフェリンの加水分解物由来の抗真菌ペプチドが、少なくとも60〜500部（重量）の割合で含有されていることを望ましい特徴としてもいる。

【0015】【発明の実施の形態】次に本発明について詳述する。【0016】本発明に使用するアゾール系抗真菌剤は、従来から用いられているアゾール系抗真菌剤のいずれでもよいが、特に、フルコナゾール、イトラコナゾール、クロトリマゾール、ゲトコナゾール又はランコナゾールが好ましい。

【0017】本発明に用いられるラクトフェリンの加水分解物は、牛乳、人乳、その他哺乳動物の乳由来のラクトフェリン、このラクトフェリンから塩を除去したデボラクトフェリン、アボラクトフェリンを母液の状態で乾燥した乾燥ラクトフェリン、これらの任意の割合の混合物（以下、これらをまとめてラクトフェリン系と記載する）を、適法により至分解物又は母液より加水分解して得た加水分解物（以下ラクトフェリン加水分解物と記載する）である。

【0018】また、本発明に使用するラクトフェリンの加水分解物由来の抗真菌ペプチドは、乾燥ラクトフェリンの加水分解物から単離されたペプチド、このペプチドと同一のアミノ酸配列を含む化学合成されたペプチド、それらの混合物、並列番号1乃至並列番号8のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するペプチド、又はこれらの2倍以上の混合物（以下、これらをまとめてラクトフェリン由来抗真菌ペプチドと記載する）である。

【0019】ラクトフェリン加水分解物を配合した本発明の抗真菌剤は、前記する抗真菌剤から明らかとなり、アゾール系抗真菌剤1部（重量、以下同じ）に対して少なくとも100部、望ましくは200〜650部、000部の割合でラクトフェリン加水分解物が配合されている。ラクトフェリン加水分解物の配合量が100部未満の場合は、薬用による抗真菌効果が認められず、250、000部を超える場合は、ラクトフェリン加水分解物の増加による抗真菌効果の増強が認められない。

【0020】また、ラクトフェリン由来抗真菌ペプチドを配合した本発明の抗真菌剤は、前記する抗真菌剤から明らかとなり、アゾール系抗真菌剤1部に対して少なくとも60〜500部、望ましくは1〜250部、000部の割合でラクトフェリン由来抗真菌ペプチドが配合されている。ラクトフェリン由来抗真菌ペプチドの配合量が0、000部未満の場合は、薬用による抗真菌効果が認められず、100、000部を超える場合は、ラクトフェリン由来抗真菌ペプチドの増加による抗真菌効果の増強が認められない。

【0021】本発明の抗真菌剤は、公知の方法により錠剤、注射剤、散剤、ローション、軟膏、ローション剤等に加工することができ、これに含有されている公知の抗真菌剤の投与方法と同様に投与することができる。ま

た、アゾール系抗菌剤を従来通り、傷口、注射、経口投与し、ラクトフェリン加水分解物又はラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを傷口投与して、感染部位で真菌の増殖を抑制あるいは殺菌することもできる。

【0022】本発明の抗菌剤の用量は、従来する試験例から明らかとなり、従来の抗菌剤の用量の1/4又は1/16以下であっても、従来の抗菌剤と同等又はそれ以上の抗菌活性を示す。

【0023】抗菌剤中の有効成分の含量は、アゾール系抗菌剤が、少なくとも3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ラクトフェリン加水分解物が、少なくとも5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、また、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチドが、少なくとも0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。

【0024】ラクトフェリン加水分解物又はラクトフェリン由来抗菌性ペプチドは、食品の成分であり、また食品としても利用されるもので、全く毒性を示さず、副作用が懸念とされる従来の抗菌剤の使用量を低減することにより、安全な抗菌剤を提供することができる。

【0025】次に試験例を示して本発明を更に詳述する。

【0026】試験例1

1) 試料の調製

アゾール系抗菌剤としてジフルカン靜注液(「ジフルカン」は登録商標、ファイザー製薬社製)から、常法により精製したフルコナーゼをリン酸緩衝液に溶解した。また、本試験例1と同一の方法で製造したラクトフェリン加水分解物を蒸留水に溶解し、滅菌凍結した。

【0027】2) 試験方法

試験管に試験培地としてサブロー・デキストロース・ブロス(1%ペプトン、2%グルコース)を1 mL 採取し、培地1 mL 当たり表1に示す濃度でフルコナーゼを加え、対照試料(単用)とした。一方、試験培地1 mL 採取し、ラクトフェリン加水分解物を培地1 mL 当たり200 μg の割合で添加し、更に表1に示す濃度でフルコナーゼを添加し、試験試料(併用)とした。

【0028】試験菌としてカンジダ・アルビカンズ菌(*Candida albicans* ID#176株、南京大地区真菌病センターから入手)を、吸光度から採取し、最終濃度の約 $10^7/\text{mL}$ の割合で希釈し試験管に添加し、37℃で1.7時間培養し、のち630nmで吸光度を測定し、菌の増殖程度を判定した。

【0029】菌の増殖程度の判定は、アゾール系抗菌剤を添加していない対照試料の試験管の示す吸光度を1.0%としたとき、吸光度が2.5%より大きい試験管を増殖(+)と表示し、2.5%以下の試験管を未増殖(-)と表示し、表1に示した。

【0030】3) 試験結果
この試験の結果は表1に示すとおりである。表1から明らかとなり、ラクトフェリン加水分解物200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 単独では、試験菌の増殖を抑制しなかった。一

方、フルコナーゼ単独では1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で増殖を抑制したが、ラクトフェリン加水分解物200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が共存することによって、増殖を抑制するのに必要なフルコナーゼ量は1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1/16)まで低減に減少した。尚、真菌及びラクトフェリン加水分解物の用量を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0031】

【表1】

試 料	フルコナーゼ濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)				
	0	0.06	0.25	1	4
ラクトフェリン加水分解物	+	+	+	+	+

【0032】試験例2

1) 試料の調製

アゾール系抗菌剤としてイトリゾールカプセル(「イトリゾール」は登録商標、ヤンセン製薬社製)から、常法により精製したイトラコナゾールを0.1%規定塩酸・ジメチルスルホキシド(ナカライテスク社製)に溶解して用いたことを除き、試験例1と同一の方法により試料を調製した。

【0033】2) 試験方法

試験例1と同一の方法によって試験を行った。

【0034】3) 試験結果

この試験の結果は表2に示すとおりである。表2から明らかとなり、ラクトフェリン加水分解物200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 単独では増殖を抑制しなかった。一方、イトラコナゾール単独では50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で増殖を抑制したが、ラクトフェリン加水分解物200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が共存することによって、増殖を抑制するのに必要なイトラコナゾール量は0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1/16)まで低減に減少した。尚、真菌及びラクトフェリン加水分解物の用量を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0035】

【表2】

試 料	イトラコナゾール濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
	0	0.1	1	5	50	500
ラクトフェリン加水分解物	+	+	+	+	+	+

【0036】試験例3

1) 試料の調製

アゾール系抗菌剤としてクロトリアゾール(シグマ社製)をジメチルスルホキシド(ナカライテスク社製)に溶解して用いたことを除き、試験例1と同一の方法により試料を調製した。

【0037】2) 試験方法

試験例1と同一の方法によって試験を行った。

【0038】3) 試験結果

この試験の結果は表3に示すとおりである。表3から明らかなとおり、ラクトフェリン加水分解物200 μ g/ml単独では増殖を抑制し得なかった。一方、クロトリマゾール単独では500ng/mlで増殖を抑制したが、ラクトフェリン加水分解物200 μ g/mlが共存することによって、増殖を抑制するのに必要なクロトリマゾール量は3.1ng/ml(1/16)まで顕著に減少した。尚、兵衛及びラクトフェリン加水分解物の恒量を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0039】

【表3】

試 料	クロトリマゾール濃度(ng/ml)					
	0	0.2	0.1	3.1	12.5	50
試験材料	+	+	+	+	+	+
対照材料	+	+	+	+	+	+

【0040】試験例4

1) 試料の調製

アゾール系抗菌剤としてケトコナゾール(シグマ社製)をジメチルスルホキシド(ナカライテスク社製)に溶解して用いたことを除き、試験例1と同一の方法により試料を調製した。

【0041】2) 試験方法

試験例1と同一の方法によって試験を行った。

【0042】3) 試験結果

この試験の結果は表4に示すとおりである。表4から明らかなとおり、ラクトフェリン加水分解物200 μ g/ml単独では増殖を抑制し得なかった。一方、ケトコナゾール単独では500ng/mlで増殖を抑制したが、ラクトフェリン加水分解物200 μ g/mlが共存することによって、増殖を抑制するのに必要なケトコナゾール量は3.1ng/ml(1/16)まで顕著に減少した。尚、兵衛及びラクトフェリン加水分解物の恒量を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0043】

【表4】

試 料	ケトコナゾール濃度(ng/ml)					
	0	0.3	3.1	12.5	50	200
試験材料	+	+	+	+	+	+
対照材料	+	+	+	+	+	+

【0044】試験例5

1) 試料の調製

アゾール系抗菌剤としてアズタット錠(「アズタット」登録商標、ツムラ社製)から精製したランコナゾールをジメチルスルホキシド(ナカライテスク社製)に溶解して用いたことを除き、試験例1と同一の方

法により試料を調製した。

【0045】2) 試験方法

試験例1と同一の方法によって試験を行った。

【0046】3) 試験結果

この試験の結果は表5に示すとおりである。表5から明らかなとおり、ラクトフェリン加水分解物200 μ g/ml単独では増殖を抑制し得なかった。一方、ランコナゾール単独では300ng/mlで増殖を抑制したが、ラクトフェリン加水分解物200 μ g/mlが共存することによって、増殖を抑制するのに必要なランコナゾール量は50ng/ml(1/16)まで顕著に減少した。尚、兵衛及びラクトフェリン加水分解物の恒量を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0047】

【表5】

試 料	ランコナゾール濃度(ng/ml)					
	0	12.5	30	300	500	5200
試験材料	+	+	+	+	+	+
対照材料	+	+	+	+	+	+

【0048】試験例6

1) 試料の調製

表4例2と同様の方法で調製したラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを蒸留水に溶解し、滅菌過濾したことを除き、試験例1と同一の方法により試料を調製した。

【0049】2) 試験方法

ラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを試験濃度1 μ lに3.1 μ gの割合で添加したことを除き、試験例1と同一の方法によって試験を行った。

【0050】3) 試験結果

この試験の結果は表6に示すとおりである。表6から明らかなとおり、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチド0.1 μ g/ml単独では増殖を抑制し得なかった。一方、フルコナゾール単独では16 μ g/mlで増殖を抑制したが、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチド0.1 μ g/mlが共存することによって、増殖を抑制するのに必要なフルコナゾール量は4 μ g/ml(1/4)に減少した。尚、兵衛及びラクトフェリン由来抗菌性ペプチドの恒量を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0051】

【表6】

試 料	フルコナゾール濃度(μ g/ml)					
	0	0.06	0.25	1	4	16
試験材料	+	+	+	+	+	+
対照材料	+	+	+	+	+	+

【0052】試験例7

1) 試料の調製

アゾール系抗真菌剤としてイトリゾールカプセル50（「イトリゾール」は登録商標、サンゼン製薬社製）から精製したイトラコナゾール（1）粉末を、ジメチルスルホキシド（ナカライテスク社製）に溶解して用いたこと及び金考例3と同様の方法で製造したラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを蒸留水に溶解し、滅菌液としたことを除き、試験例1と同一の方法により試験を調製した。

【0053】2）試験方法

ラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを試験液101に3.1μgの割合で添加したことを除き、試験例1と同一の方法によって試験を行った。

【0054】3）試験結果

この試験の結果は表7に示すとおりである。表7から明らかとなり、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチド0.1μg/μl単独では増殖を抑制し得なかった。一方、イトラコナゾール単独では50ng/μlで増殖を抑制したが、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチド0.1μg/μlが共存することによって、増殖を抑制するのに必要なイトラコナゾール量は12.5ng/μl（1/4）まで減少した。尚、真菌及びラクトフェリン由来抗菌性ペプチドの効果を更にして試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0055】

【表7】

試 料	イトラコナゾール濃度 (ng/μl)					
	0	3.1	12.5	50	200	500
対照液	+	+	+	+	+	+
試験液	+	+	+	+	+	+

【0056】試験例8

1）試料の調製

アゾール系抗真菌剤としてグロトリマゾール（シグマ社製）をジメチルスルホキシド（ナカライテスク社製）に溶解して用いたこと及び配列番号5のラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを蒸留水に溶解し、滅菌液としたことを除き、試験例1と同一の方法により試験を調製した。

【0057】2）試験方法

ラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを試験液101に3.1μgの割合で添加したことを除き、試験例1と同一の方法によって試験を行った。

【0058】3）試験結果

この試験の結果は表8に示すとおりである。表8から明らかとなり、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチド0.1μg/μl単独では増殖を抑制し得なかった。一方、グロトリマゾール単独では50ng/μlで増殖を抑制したが、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチド0.1μg/μlが共存することによって、増殖を抑制するのに必

要なグロトリマゾール量は12.5ng/μl（1/4）まで減少した。尚、真菌及びラクトフェリン由来抗菌性ペプチドの効果を更にして試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0059】

【表8】

試 料	グロトリマゾール濃度 (ng/μl)						
	0	0.2	0.8	3.1	12.5	50	500
対照液	+	+	+	+	+	+	+
試験液	+	+	+	+	+	+	+

【0060】試験例9

1）試料の調製

アゾール系抗真菌剤としてゲトコナゾール（シグマ社製）をジメチルスルホキシド（ナカライテスク社製）に溶解して用いたこと及び配列番号6のラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを蒸留水に溶解し、滅菌液としたことを除き、試験例1と同一の方法により試験を調製した。

【0061】2）試験方法

ラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを試験液101に3.1μgの割合で添加したことを除き、試験例1と同一の方法によって試験を行った。

【0062】3）試験結果

この試験の結果は表9に示すとおりである。表9から明らかとなり、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチド0.1μg/μl単独では増殖を抑制し得なかった。一方、ゲトコナゾール単独では50ng/μlで増殖を抑制したが、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチド0.1μg/μlが共存することによって、増殖を抑制するのに必要なゲトコナゾール量は12.5ng/μl（1/4）まで減少した。尚、真菌及びラクトフェリン由来抗菌性ペプチドの効果を更にして試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0063】

【表9】

試 料	ゲトコナゾール濃度 (ng/μl)						
	0	0.2	0.8	3.1	12.5	50	500
対照液	+	+	+	+	+	+	+
試験液	+	+	+	+	+	+	+

【0064】試験例10

1）試料の調製

アゾール系抗真菌剤としてアスタット酸（「アスタット」は登録商標、フマラ社製）から精製したランコネールをジメチルスルホキシド（ナカライテスク社製）に溶解して用いたこと及び配列番号7のラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを蒸留水に溶解し、滅菌液とし

たことを除き、試験例1と同一の方法により試料を調製した。

【0.065】2) 試験方法

ラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを試験地10.1に3:1の割合で添加したことを除き、試験例1と同一の方法によって試験を行った。

【0.066】3) 試験結果

この試験の結果は表10に示すとおりである。表10から明らかなとおり、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチド3:1の割合で添加したことで、増殖を抑制し得なかった。一方、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチド3:1の割合で添加したことで、増殖を抑制するのに必要なラクトフェリン量は80.0 g/100 g (1/4)まで減少した。尚、抗菌性及びラクトフェリン由来抗菌性ペプチドの効果を比較して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0.067】

【表10】

試料	ラクトフェリン/ペプチド濃度 (g/100g)					
	0	32.5	50	200	800	3200
増殖抑制率 (%)	0	0	0	0	0	0

【0.068】- 参考例1

ラクトフェリン(シグマ社製)50.0 gを精製水0.9 gに溶解し、0.1 M塩酸でpHを2.5に調整し、のち市販のブタペプチン(シグマ社製)1.0 gを添加し、37℃で6時間加水分解した。次いで0.1 M塩酸でpHを7.0に調整し、80℃で10分間加熱して酵素を失活させ、直ちに冷却し、1.5%のpHで10分間遠心分離し、透明な上清を得た。この上清を凍結乾燥し、ラクトフェリン加水分解物を得た。

【0.069】- 参考例2

参考例1で製造したラクトフェリン加水分解物を水に溶解し、10.0 mLにTSKゲルODS-120T(東ソー社製)を用いた高速液体クロマトグラフィーにかけ、0.8 mL/分の流速で試料注入後10分間0.05% TFA(トリフルオロ酢酸)を含む2.0%アセトニトリルで溶出し、のち30分間0.05% TFAを含む2.0%アセトニトリルのグラジエントで溶出し、2.4~2.5分の間に溶出する成分を集め、真空乾燥した。この乾燥物を2% (w/v)の濃度で精製水に溶解し、再度TSKゲルODS-120T(東ソー社製)を用いた高速液体クロマトグラフィーにかけ、0.8 mL/分の流速で試料注入後10分間0.05% TFAを含む2.4%アセトニトリルで溶出し、のち30分間0.05% TFAを含む2.4~3.2%のアセトニトリルのグラジエ

ントで溶出し、3.3~3.5分の間に溶出する60分を集め、上記の操作を25回反復し、真空乾燥し、配列番号1のラクトフェリン由来抗菌性ペプチド約1.5 mgを得た。

【0.070】- 参考例3

ペプチド自動合成装置(ファルマシアLKBバイオテック社製、LKB 8000)を用いて、0.1 M NaHCO₃ (pH 7.0)を用いて、フェリット等による固相ペプチド合成法[ジャーナル・オブ・ケミカル・ソサエティ・パーキン(1966, Journal of Chemical Society, Perkin, 1), 第538頁, (1966年)]に基づいてペプチドを次のようにして合成した。

【0.071】アミノ官能基を9-フルオレニルメチルカルボニル基で保護したアミノ酸(以下Fmoc-アミノ酸)またはFmoc-アミノ酸の名称(例えば、Fmoc-アスパラギン)と記載することがある)に、N,N-ジクロロベンジルカルボジイミドを添加して所望のアミノ酸の無水物を生成させ、このFmoc-アミノ酸無水物を合成に用いた。ペプチド鎖を延伸するためにC-末端のセリン残基に相当するFmoc-セリン無水物を、そのカルボキシ基を介し、ジメチルアミノピリジンと触媒としてクルドロン(ファルマシアLKBバイオテック社製)に固定する。次いでこの樹脂をピペリジンと含むジメチルホルムアミドで洗浄し、C-末端アミノ酸のアミノ官能基の保護基を除去する。このアミノ酸系列のC-末端から各目に相当するFmoc-アスパラギン酸無水物を前記C-末端アミノ官能基を介して樹脂に固定されたセリンの残基のアミノ官能基にカップリングさせた。以下同様にして、所望のアミノ酸系列のペプチド鎖が形成された後、0.5% TFA、5% フェノール、および1% エタノールからなる溶媒でアセトアミドメチル以外の保護基の除去およびペプチドの脱離を行い、自然酸化によりジスルフィド結合を形成し、高速液体クロマトグラフィーによりペプチドを精製し、この溶液を凍結乾燥して、ペプチド粉末を得た。

【0.072】前記のペプチドについてペプチドシーケンサーを用いて常法によりアミノ酸配列を分析し、5分間、母3に記載のアミノ酸配列を有することを確認した。

【0.073】次に実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例により限定されるものではない。

【0.074】

【実施例1】

ラクトフェリン(シグマ社製)1.0 gに対して参考例1の方法で製造したラクトフェリン加水分解物1.0 g割合で混合し、常法により凍結乾燥剤を製造した。

【0.075】- 参考例2

注射用水(大塚製薬社製)10 mLに、ラクトフェリン

13

(シグマ社製) 100g、参考例2の方法で製造した配列番号1のラクトフェリン由来抗菌性ペプチド100mg、
 2. 塩化ナトリウム(和光純薬社製) 1000mgを溶解し、pHを7に調整し、過塩素酸を1mLずつアンブールに添加し、注射用の抗菌剤10倍を得た。

【0076】実施例3

参考例3の方法で製造した配列番号3のラクトフェリン由来抗菌性ペプチド1g、パラオキシ安息香酸メチル(ナカライテスク社製) 0.1g、パラオキシ安息香酸プロピル(ナカライテスク社製) 0.1g、プロピレングリコール(ナカライテスク社製) 1.2g、精製水27.8gを加温しながら材料溶解した。別に予め、クロトリファンール(シグマ社製) 5mg、白色ワセリン(ナカライテスク社製) 25g、ステアリンアルコール(ナカライテスク社製) 20g、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油(ナカライテスク社製) 4g、モノステアリン酸グリセリン(ナカライテスク社製) 1gを加温しながら材料混合した溶液を前記溶剤に添加し、ホモミキサーを用いて乳化し、O/W型クリームを調整し、10gずつアルミチューブに充填し、外用抗菌剤10倍を得た。

【0077】

【発明の効果】以上詳述したとおり、本発明は、アミノ-

14

キル系抗菌剤及びラクトフェリン加水分解物又はラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを有効成分として含有する抗菌剤であり、本発明により寄せられる効果は次のとおりである。

【0078】1) 本発明の抗菌剤は、少量で高い抗菌効果を示すので、従来の抗菌剤の代替剤として使用できる。

【0079】2) 本発明の抗菌剤は、消化管内でのカンジダ菌の異常増殖の防止手段としても、安全に使用できる。

【0080】3) 本発明の抗菌剤は、副作用が少なく、耐性菌の出現頻度が低下する。

【0081】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 25

配列の型: アミノ酸

トポロジ: 直鎖状

配列の相対: ペプチド

配列の結合: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、3番のCysと26番のCysがジスルフィド結合している。

配列:

Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Pro Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe
 20 25

【0082】配列番号: 2

配列の長さ: 25

配列の型: アミノ酸

トポロジ: 直鎖状

配列の相対: ペプチド

※配列の結合: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列においてCys¹⁶は、ジスルフィド結合の形成を防止するため、チオール基を化学的に修飾したシステインを示す。

配列:

Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Pro Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe
 20 25

【0083】配列番号: 3

配列の長さ: 25

配列の型: アミノ酸

トポロジ: 直鎖状

※配列の相対: ペプチド

配列の結合: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、3番のCysと20番のCysがジスルフィド結合している。

配列:

Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly
 1 5 10 15
 Pro Phe Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser
 20 25

【0084】配列番号: 4

配列の長さ: 25

配列の型: アミノ酸

トポロジ: 直鎖状

配列の相対: ペプチド

配列の結合: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列においてCys¹⁶は、ジスルフィド結合の形成を防止するため、チオール

15
基を化学的に修飾したシステインを示す。

配列:

Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly
1 5 10 15
Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser
20 25

【0085】配列番号: 5

配列の長さ: 47

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直線状

配列の修飾: ペプチド

配列の修飾: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下位配列において、配列上

*の長さが36であって9番、26番、及び35番の Cys と有するペプチドの、9番の Cys と26番の Cys とがジスルフィド結合し、上記配列の長さ36のペプチドの35番の Cys が、配列の長さ11であって10番に Cys を有するペプチドの10番の Cys とがジスルフィド結合している。

配列:

Val Ser Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn
1 5 10 15
Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp
20 25 30
Ser Pro Ile Gln Cys Ile
35
Gln Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala
1 5 10

【0086】配列番号: 6

配列の長さ: 47

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直線状

配列の修飾: ペプチド

*配列の修飾: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下位配列において、10番の Cys と46番の Cys とがジスルフィド結合し、20番の Cys と37番の Cys とがジスルフィド結合している。

配列:

Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser Gln Pro
1 5 10 15
Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val
20 25 30
Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln
35 40 45
Cys Ile

【0087】配列番号: 7

配列の長さ: 36

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直線状

配列:

Val Ser Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn
1 5 10 15
Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp
20 25 30
Ser Pro Ile Gln Cys Ile
35

【0088】配列番号: 8

配列の長さ: 11

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直線状

配列の修飾: ペプチド

配列の修飾: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド

17

(10)

特開平9-169342

18

図24

City Arg Arg Arg Arg Ser Vel Clo Top Ops Ala

1

5

10

フロントページの続き

(72)発明者 川内 恒三

神奈川県横浜市京浜5-1-83 森永乳業
株式会社栄養科学研究所内

(72)発明者 山内 恒治

神奈川県横浜市京浜5-1-83 森永乳業
株式会社栄養科学研究所内

(72)発明者 吉村 裕之

神奈川県横浜市京浜5-1-83 森永乳業
株式会社栄養科学研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.